云 南 植 物 研 究 1989; 11(3): 247—253
Acta Botanica Yunnanica

烟草花叶病毒外壳蛋白的基因导入和转化烟株的再生

李 英 胡运乾 陈文岗 王 钧

(中国科学院昆明植物研究所，昆明)

摘要 用T-DNA区携有嵌合的烟草花叶病毒外壳蛋白基因和卡那霉素抗性基因（NPTⅡ）的土壤农杆菌株pACK403和pACK404与烟草品种SR1和斯佩特G-28单倍体无菌菌叶碟片进行共培养转化。转化后的叶碟片在含有头孢噻肟钠500毫克/升和卡那霉素300毫克/升的培养基上诱导芽，在含有头孢噻肟钠500毫克/升和卡那霉素100毫克/升的培养基上诱导生根。Nopaline测定，烟草花叶病毒外壳蛋白基因的表达检测、转化烟株对烟草花叶病毒侵染抗性的检测结果证明：用这种方法能可靠地将外源基因导入烟草，并能在转化烟株中表达。再生得到的转化烟株在烟草花叶病毒强感染情况下能延迟病症表现4—25天。

关键词 烟草花叶病毒；外壳蛋白嵌合基因；共培养转化

烟草花叶病毒病是一种在烟草及蔬菜等经济作物中广泛传播的一种病毒病害，对农业生产造成了很大的危害，而目前还没有行之有效的防治方法。

我们根据交叉保护原理，构建了烟草花叶病毒外壳蛋白的嵌合基因，并将它导入了工程化Ti质粒的T-DNA区得到土壤农杆菌株pACK403和pACK404[1]。目的是利用植物基因工程的方法将烟草花叶病毒外壳蛋白基因导入烟草并在转化的烟株中表达，使其获得对烟草花叶病毒的抗性。Powell Abel等人和 Nilgun E. Tumer 等人已分别将烟草花叶病毒和苜蓿花叶病毒外壳蛋白基因导入烟草和蕃茄，并在转化的工程植株及它们的后代中观察到病毒外壳蛋白的表达和在感染病毒后可延迟发病的现象[2, 3]。

将外源基因导入植物体内的方法很多[4-6]，但用叶碟片与土壤农杆菌共培养的方法具有简便、快速、易于操作和不需特殊条件等优点，大约50—60天就可得到转化小苗。R. B. Horsch等人和Sheila McCormick 等人利用此方法分别得到了矮牵牛和蕃茄的转化植株[7, 8]。我们用这个方法并结合卡那霉素抗性筛选得到了具有卡那霉素抗性的转化植株。这些转化植株中表达Nopaline阳性为74%，表达烟草花叶病毒外壳蛋白阳性为71.1%，62.2%的转化烟株能延迟病症表现4—25天。

材料和方法

土壤农杆菌和烟草叶碟片共培养转化

1988-08-13收稿

土壤农杆菌株pACK403，pACK 404（图1）：pACK403中外壳蛋白基因35S启动子取向和NPTⅡ基因NOS启动子取向相同，cACK404中外壳蛋白基因35 S启动子取向和NPTⅡ基因NOS 启动子取向相反。菌株经斜面培养活化后接种于 LB 液体培养基，28℃摇床培养16—18小时。细菌培养液用 MS 液体培养基稀释10倍。取培养20—30天的烟草品种SR1 无菌苗和斯佩特G-28单倍体无菌苗（由花药培养得到）的舒展叶片，用手术刀切成1cm²的小片。将小叶片轻轻漂浮在稀释后的细菌培养液中1小时，取出用无菌滤纸吸干菌液，倒置在附加NAA0.1毫克/升，6-BA 1毫克/升的MS固体培养基上。25℃，光照1000 lx，16小时/天，共培养3天。取出转到含头孢噻肟钠（四川长征制药厂产品）500毫克/升，卡那霉素（Sigma产品）300毫克/升，NAA0.1毫克/升，6-BA 1毫克/升的MS固体培养基上继续培养。待小芽长出后，切下小芽转到含头孢噻肟钠500毫克/升，卡那霉素100毫克/升的 MS 固体培养基上诱导生根。得到生根小苗后切下顶端放到含卡那霉素100毫克/升的MS固体培养基上再生根。

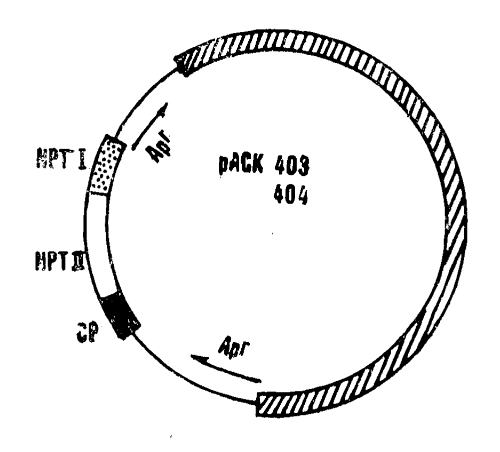


图1　土壤农杆菌株pACK 403、pACK404的质粒结构

Fig. 1　The structure of the plasmids of *Agrobacterium*, pACK403, pACK404

卡那霉素抗性小苗的检测

Nopaline测定[9]：取卡那霉素抗性小苗叶片，用玻璃棒在 Eppendorf 离心管中捣碎，12000转/分钟离心10分钟，取上清液20微升在Whatman 3 MM滤纸上点样，电泳缓冲液为甲酸：乙酸：水（5：15：80），400伏，电泳1.5小时，用坂口试剂显色，Nopaline泳向负极。

烟草花叶病毒外壳蛋白基因表达的检测

烟草花叶病毒的酶标免疫测定参照马德芳等人的方法[10]。

转化烟株对烟草花叶病毒侵染的抗性试验

用4微克／升的烟草花叶病毒溶液，金刚砂磨擦接种法，接种温室内栽培的烟草SR1转化苗和斯佩特G-28单倍体转化苗，以未转化的烟草 SR1和斯佩特G-28单倍体苗为对照，接种后用清水冲去接种液。

结果和讨论

不同共培养转化方法的比较

不同的作者在进行共培养转化时所采用的方法和条件不尽相同，我们对共培养方法和条件进行了如下比较：

1.细菌培养液用 MS 液体培养基稀释50倍，烟草叶碟片在菌液上漂浮培养24小时，

取出用无菌水冲洗 3 次，用无菌滤纸吸干，倒置在含头孢噻肟钠500毫克/升，NAA0.1毫克／升，6 -BA1毫克／升的MS固体培养基上。培养 2 天后，叶片周围长满菌，叶片发黄，再继续培养，菌盖满叶片，叶片枯黄，逐渐死亡。

2.细菌培养液用MS液体培养基稀释50倍，烟草叶碟片在菌液上漂浮培养12 小时，取出用无菌水冲洗 3 次，用无菌滤纸吸干，倒置在上述培养基上。培养 3 天后，出现少量菌，叶片微发黄。取出叶碟片再转到上述培养基中，两天后，仍出现菌，叶片发黄，几乎不生长。

3.细菌培养液用MS液体培养基稀释10倍，烟草叶碟片在菌液上漂浮培养 1 小时，用无菌滤纸吸干菌液，先倒置在附加NAA 0.1毫克／升，6 -BA 1 毫克／升的MS 固体培养基上共培养 3 天，再转到含头孢噻肟钠500毫克／升，卡那霉素300毫克/升，NAA 0.1毫克／升，6 -BA 1 毫克／升的MS固体培养基上。叶片四周围没出现菌。SR1 10天左右叶片四周出现小芽，斯佩特G-28 15天左右叶片四周出现小芽。20—25天后切下小芽转到含头孢噻肟钠500毫克／升，卡那霉素100毫克／升的MS固体培养基上生根。SR1大约20—30天就可得到小苗，斯佩特G-28的小苗根部会出现少量菌，需再一次抑菌。

结果表明，细菌培养液与叶碟片的共培养方法和条件是转化能否成功的关键。菌液与叶碟片的共培养只需短时间即可完成，用滤纸吸干菌液已可以去掉大部分细菌，表面的细菌可被头孢霉素抑制。而共培养时间太长，菌液渗透到叶片深部，给后面的抑菌造成困难。

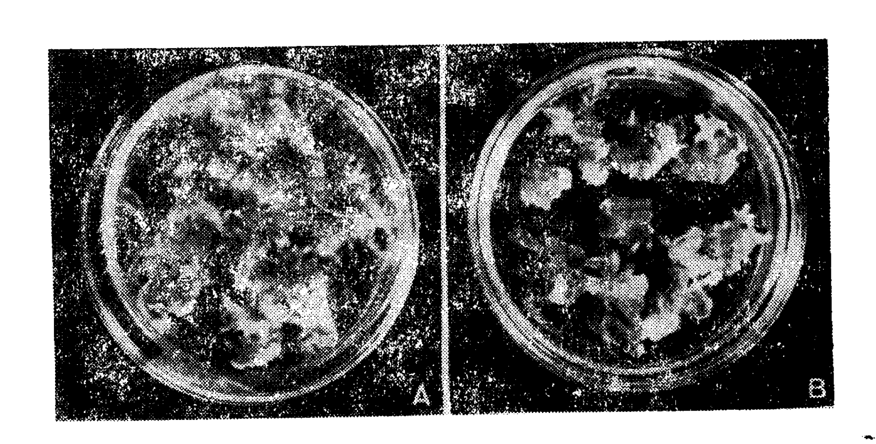


图 2　烟草SR1转化叶碟片在含有不同浓度的卡那霉素培养基上诱导得到芽

A．烟草SR1叶碟片在含有卡那霉素100毫克/升培养基上再生的芽；

B．烟草SR1叶碟片在含有卡那霉素300毫克/升培养基上再生的芽。

Fig. 2 The shoots regenerated from transferred tobacco leaf discs cultured on the medium containing difference kanamycin concentration.

A. The shoots regeneraed from the transfomed leaf disc of tobacco SR1 on the medium containing 100 mg kanamycin per liter.

B. The shoots regenerated from the transformed leaf disc of tobacco SR1 on the medium containing 300 mg kanamycin per liter.

不同浓度的卡那霉素筛选效果比较

我们进行了如下对比试验，经共培养转化后的叶碟片分别在卡那霉素浓度为300毫克／升和100毫克/升的含NAA0.1毫克/升，6-BA 1毫克/升的MS培养基上诱导芽，以用MS-LB(10：1)的培养基代替菌液处理后的SR1叶碟片为对照。3天后对照叶碟片变黄不生长，共培养转化后的叶碟片四周变绿，出现少许愈伤组织，叶碟片中间微黄。10天后，对照由黄变白，逐渐死亡，处理的叶碟片四周出现小芽（图2）。15天后将小芽切下，转接到含卡那霉素100毫克/升的MS基本培养基上诱导生根。不同浓度卡那霉素筛选得到的小芽及生根情况如表1。

表1 不同浓度卡那霉素筛选得到的小芽生根效果比较

Table 1 The comparation of the number of shoots and roots regenerated from different kanamycin concentration

诱导芽的卡那霉素浓度 mg/l	出芽数/叶碟片	诱导根的卡那霉素浓度 mg/l	生根数/叶碟片	生根率 %
300	4	100	4	100
100	7	100	5	71

我们还进行了转化再生烟株在含有不同浓度的卡那霉素的MS基本培养基上生根试验。在所试验的12株转化苗中，10株能在含卡那霉素300毫克／升或400毫克／升的培养基上正常分化生根，而对照未转化株在含卡那霉素50毫克／升的培养基上无一生根，在含卡那霉素400毫克/升的培养基上，植株黄萎（图3）。

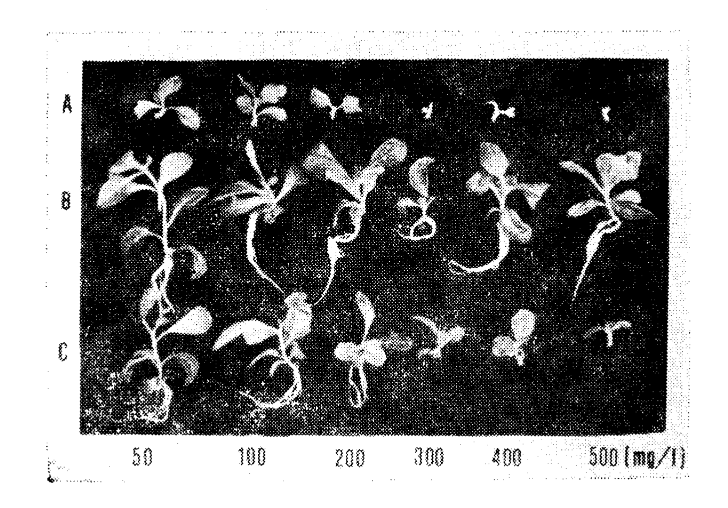


图3 培养小苗在不同浓度的卡那霉素培养基上生根的情况
A.正常烟苗（未转化烟苗）；B.转化烟苗104；C.转化烟苗111。

Fig. 3 The roots inducement of transgenic seedling on the medium containing difference kanamycin concentration

A. Normal tobacco control, B. Transgenic tobacco 104, C. Transgenic tobacco 111

由此可以看出，未经过共培养转化的叶碟片在含有卡那霉素的培养基上不能正常生长，卡那霉素对正常植物细胞的生长有抑制作用。在含有300毫克/升卡那霉素培养基上诱导芽，100毫克/升卡那霉素培养基上诱导生根，可以排除假阳性的出现，提高筛选的可靠性。

转化植株的Nopaline测定和外壳蛋白基因的表达检测

对卡那霉素抗性筛选后的转化植株中标记基因产物Nopaline的测定结果表明，在所测定的150株转化植株中Nopaline表达阳性植株有111株，没有测到Nopaline表达的有39株。由此可以看出利用卡那霉素抗性标记基因筛选得到的再生植株中有74%为Nopaline阳性植株。

转化烟株中烟草花叶病毒外壳蛋白基因的表达产物外壳蛋白的酶标免疫测定结果表明，在所测定的69株植株中，烟草花叶病毒外壳蛋白表达阳性者为49株，占71.1%。在外壳蛋白表达阳性的转化植株中，外壳蛋白表达量也有很大的差异，表达量为10毫微克／100微克蛋白至100毫微克/100微克蛋白不等，表达最强者其烟草花叶病毒外壳蛋白表达量大于100毫微克／100微克蛋白。

从以上结果可以看出，用同一方法向同一植物导入同一外源基因后，外源基因在转化植株中的表达强度也可能会有很大的差异。这种现象可能与外源基因导入植物细胞后在植物染色体上的整合位点，整合拷贝数，和外源基因在植物细胞内的修饰情况等因素有关。

转化烟株对外源烟草花叶病毒侵染抗性的检测

为了确保这项测定的可靠性，我们选用了较高的烟草花叶病毒接种浓度。美国孟山都公司Abel等人在进行该项试验时使用的病毒接种液浓度为每毫升 0.2—2.0 微克[1]，而我们在进行病毒感染试验时所采用的病毒液浓度为每毫升 4 微克。在接种方法上，我





图 4　转化烟株能够延迟烟草花叶病毒病症状表现

A. 烟草花叶病毒感染后的正常烟株；B. 烟草花叶病毒感染后的转化烟株

Fig. 4　Suppression of TMV diseas symptoms by transgenic tobacco plant

A. Normal tobacco control plant inoculated with TMV, B. Transgenic tobacco plant inoculated with TMV

们采用了较强烈的金钢砂磨擦接种，以对照株全部发病后第二天起算延迟时间，保证了每次感染的接种率均为100%。所进行的99株转化苗的感染试验结果表明，能延迟病症表现4—25天的抗性株有62株，占感染烟株的62.2%。我们还发现转化烟株在感染病毒后对烟株的生长影响较弱，表现病症后烟株仍然能较正常生长，而未转化烟株（对照株）在表现病症后植株黄萎，新叶不能正常生长、萎缩，植株矮小（图4）。

上述试验结果表明，我们已成功地将自己构建的烟草花叶病毒外壳蛋白嵌合基因导入了烟草，并且在转化烟草植株中得到了表达，使由转化细胞得到的烟草植株具有对外源烟草花叶病毒侵染的抗性，能在较强的病毒感染条件下延迟病症表现4—25天。我们运用基因工程的方法获得了抗烟草花叶病毒侵染的烟草植株。这也证明了植物基因工程在解决农业生产中一些难以解决的迫切问题方面是一种强有力的手段。

当然，从目前的结果到生产上使用转化植物的种子还有相当长的一段路要走，导入烟草的外源基因是否可行或如何促使它在后代中稳定地传递、表达还待研究。

致谢 本工作得到云南省科委经费支持

参 考 文 献

1 王钧，胡运乾，陈荣苑．云南植物研究 1987；9(4)：455—462

2 Powell Abel P, Nelson Rs, De B et al. *Science* 1986; 232: 738—743

3 Nilgun E Teuner, Keith M Connell, Richard S Nelson et al. *EMBO J* 1987; 1181—1188

4 Hauptmann R M, Ozias Akins P, Vasil V et al. *Plant Cell Reports* 1987; 6: 265—270

5 Uchimiya H, Hirochika H, Hashimoto H et al. *Mol Gen Genet* 1986; 205: 1—8

6 Guang Yuzhou, Jian Weng, Yishen Qian et al. *Methods in Enzymology* 1986; Volume 101

7 Horsch R B, Fry J E, Hoffmann N L et al. *Science* 1985; 227: 1229—1231

8 Sheila Mccormick, Niedermeyer J, Fry J et al. *Plant Cell Reports* 1986; 5: 81—84

9 Otten L A B M, Schilperoort R A. *Bichem Biophy Acta* 1978; 527: 497—500

10. 马德芳，邱并生，田波．微生物学报 1981；21(1)：63—67

THE INTRODUCTION OF CHIMERIC COAT PROTEIN GENE OF TOBACCO MOSAIC VIRUS AND THE REGENERATION OF TRANSGENIC TOBACCO PLANT

Li Ying, Hu Yunqian, Chen Wengang, Wang Jun

(*Kunming Instiiute of Botany, Aeademia Sinica, Kunming*)

Abstract The *Agrobacterium* strains pACK403 and pACK404, in which the chimeric coat protein gene of tobacco mosaic virus and NPT Ⅱ gene were inserted into the T-DNA region, were used to transform the leaf discs of tobacco special SR1 and special G28 (haploid) with cocultivation method. The transformed discs were cultured on the medium containing sodium cefotaximate 500mg/l and kanamycin 300mg/l to induce shoots, then the shoots were cut and cultured on the medium containing sodium cefotaximate 500 mg/l and kanamycin 100mg/l to induce roots. The results of Nopaline detection, the gene expression determination of TMV coat protein, and the resistant test of transgenic tobacco plant against TMV infection showed that this method can be reliably used to introduce foreign genes into tobacco plant and that the TMV coat protein genes have been expressed in transgenic tobacco plant. Under the strong infection condition, fhe transgenic tobacco plant could delay the presence of disease symptom of TMV for 4 to 25 days.

Key words Tobacco Mosaic Virus; Chimeric coat protein gene; Co-culture transformation